

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/050817

International filing date: 25 February 2005 (25.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT  
Number: PD 2004 A 000053  
Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 June 2005 (28.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

EP05/50817



# Ministero delle Attività Produttive

*Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività*

*Ufficio Italiano Brevetti e Marchi*

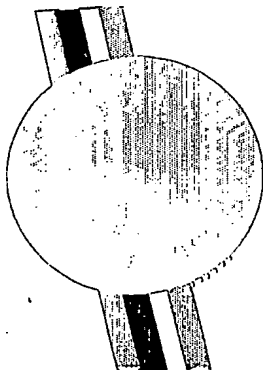
*Ufficio G2*



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:  
INVENZIONE INDUSTRIALE N. PD 2004 A 000053**

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Roma, li.....2.4.610.2005.....



IL FUNZIONARIO

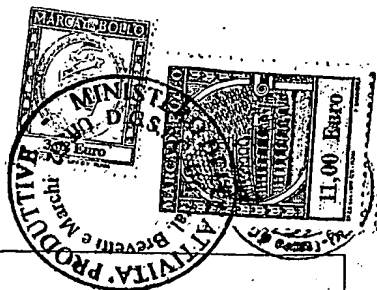
*Massimo Piergallini*

■ Dr. Massimo Piergallini

# MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° PD 2004 A 000053



## A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.R.L.		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PG	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 C.F. 01510440744
INDIRIZZO COMPLETO	A4	VIA PONTE DELLA FABBRICA 3/B 35031 ABANO TERME (PD)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1			
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2		COD. FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4			
<b>B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO</b>	B0	D	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)	
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1	FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.R.L.		
INDIRIZZO	B2	VIA PONTE DELLA FABBRICA 3/B		
LOCALITÀ/PROVINCIA	B3	35031 ABANO TERME (PD)		
<b>C. TITOLO</b>	C1	BIOMATERIALI COSTITUITI DA DERIVATI DELL'ACIDO IALURONICO COME NUOVA TERAPIA DI CURA PER LA PROTEZIONE E LA RIPARAZIONE DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE DANNEGGIATA PER OSTEOARTROSI		

## D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	HOLLANDER ANTHONY P.
NAZIONALITÀ	D2	INGLESE
COGNOME E NOME	D1	PAVESIO ALESSANDRA
NAZIONALITÀ	D2	ITALIANA
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	

## E. CLASSE PROPOSTA

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2	E3	E4	E5

## F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DI DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI

FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	G1	
--------------------------------	----	--

# MODULO A (2/2)

## I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 N. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	I1	
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	
INDIRIZZO	I3	
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	

## M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)	2		25
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 2 ESEMPLARI)	2		5
DECLARAZIONE D'INVENTORE			
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			

(SI/NO)

LETTERA D'INCARICO

PROCURA GENERALE

RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE

(LIRE/EURO)

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE

ATTESTATI DI VERSAMENTO

FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI  
PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI)

DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA

AUTENTICA? (SI/NO)

SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL  
PUBBLICO? (SI/NO)

DATA DI COMPILAZIONE

F. DEL/DEI

RICHIEDENTE/I

EURO	
A	
SI	
NO	

DUECENTONOVANTUNO,OTTANTA-----

D		F	
---	--	---	--

24 FEBBRAIO 2004

## VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	PD 2004 A 000053		
C.C.I.A.A. DI	PADOVA		COD. 28
IN DATA	27/2/2004	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME	
LA PRESENTE DOMANDA CORREDATA DI N.		FOGLI AGGIUNTIVI PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRARIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE			
IL DEPOSITANTE	TIMBRO DELL'UFFICIO	L'UFFICIALE ROGANTE (Salerni Norma)	

PD 2004

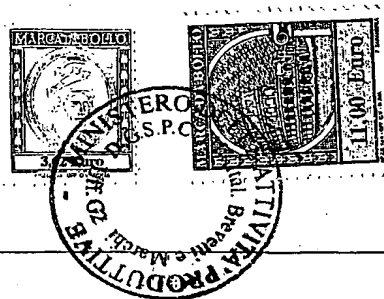
**PROSPETTO MODULO A**  
**DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE**

NUMERO DI DOMANDA:	4000053	DATA DI DEPOSITO:	
A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO			
FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.R.L., VIA PONTE DELLA FABBRICA 3/B, 35031 ABANO TERME (PD)			
C. TITOLO			
BIOMATERIALI COSTITUITI DA DERIVATI DELL'ACIDO IALURONICO COME NUOVA TERAPIA DI CURA PER LA PROTEZIONE E LA RIPARAZIONE DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE DANNEGGIATA PER OSTEOARTROSI			

	SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E. CLASSE PROPOSTA					

**O. RIASSUNTO**

LA PRESENTE INVENZIONE SI RIFERISCE A BIOMATERIALI COSTITUITI DA DERIVATI DELL'ACIDO IALURONICO LAVORATI IN FORMA DI STRUTTURE TRIDIMENSIONALI, EVENTUALMENTE CONTENENTI ANCHE CONDROCITI E/O CELLULE MESENCHIMALI, COME NUOVA TERAPIA SIA PER LA PREVENZIONE DELLA DEGRADAZIONE DELLA MATRICE CARTILAGINEA CHE PER LA RIPARAZIONE DELLA CARTILAGINE ARTICOLARE DANNEGGIATA IN SEGUITO A PATOLOGIA OSTEOARTRITICA/OSTEOARTROSICA, ARTRITE REUMATOIDE E ARTRITE PSORIASICA.



**P. DISEGNO PRINCIPALE**

FIRMA DEL/DEI  
RICHIEDENTE/I

*Enrico Allpaur*



Descrizione di una invenzione industriale dal titolo *"Biomateriali costituiti da derivati dell'acido ialuronico come nuova terapia di cura per la protezione e la riparazione della cartilagine articolare danneggiata per osteoartrosi"* della Fidia Advanced Biopolymers S.r.l. con sede in Via Ponte della Fabbrica, 3/B - 35031 Abano Terme (PD), nella persona del suo Presidente Dr. Emilio Mauri.

Inventori designati: Anthony P. Hollander

Alessandra Pavesio

Depositata il ..... con n°

**PD 2004 A000053**

OGGETTO DELL'INVENZIONE

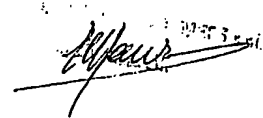
La presente invenzione si riferisce a biomateriali costituiti da derivati dell'acido ialuronico lavorati in forma di strutture tridimensionali, eventualmente contenenti anche condrociti e/o cellule mesenchimali, come nuova terapia sia per la prevenzione della degradazione della matrice cartilaginea che per la riparazione della cartilagine articolare danneggiata in seguito a patologia osteoartritica/osteoartrosica, artrite reumatoide e artrite psoriasica.

CAMPO DELL'INVENZIONE

L'osteoartrosi (OA) è una patologia caratterizzata dall'erosione della cartilagine articolare associata al rimodellamento della componente ossea subcondrale con formazione di osteofiti.

Le principali cause della suddetta patologia sono rappresentate da cambiamenti meccanici e biochimici che coinvolgono l'articolazione nella sua complessità.





Questi cambiamenti meccanici possono essere determinati da incongruenze del sistema articolare legate a molteplici possibili concause come, ad esempio, quelle di seguito elencate:

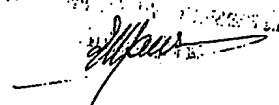
- lassità dei sistemi capsulari;
- presenza di corpi ossei liberi all'interno del sistema articolare;
- rottura dei menischi;
- trauma dell'articolazione;
- erosioni e/o incrostazioni della capsula articolare, dei legamenti e/o dei menischi dovuti al processo d'invecchiamento cartilagineo;
- infiammazione del sistema articolare.

Un eccessivo e/o non corretto caricamento delle articolazioni può determinare una risposta condrocitaria che si esprime nella sintesi di enzimi responsabili della degradazione della cartilagine stessa.

I cambiamenti biochimici conseguenti a questa degradazione cartilaginea si traducono in un richiamo macrofagico e, dunque, in una flogosi che coinvolge anche la membrana sinoviale dove, spesso, si può osservare una reazione infiammatoria che porta alla sintesi di citochine pro-infiammatorie (come, ad esempio, IL-1), che diffondono nel liquido sinoviale per attivare i condrociti a produrre anch'essi citochine pro-infiammatorie (come IL-1, TNF, IL-6).

Questa super-espressione di IL-1 è cruciale per la patogenesi dell'OA. Infatti, IL-1 promuove la sintesi, la secrezione e l'attivazione delle metalloproteasi (MMP) da parte dei condrociti, enzimi proteasici





responsabili della degradazione della matrice cartilaginea, prevalentemente costituita da collagene e proteoglicani.

Inoltre, la suddetta citochina risulta anche essere un inibitore della proliferazione condrocitaria, sopprime la produzione degli inibitori naturali di queste metalloproteasi (TIMPs), stimola la sintesi di alti livelli di ossido nitrico (NO) da parte dei condrociti stessi, mentre inibisce la sintesi del collagene di tipo II e di aggregano, componente principale dei proteoglicani che costituiscono la cartilagine (Kafienah W. et al., Arthritis Rheum. 2003, 48:709-718).

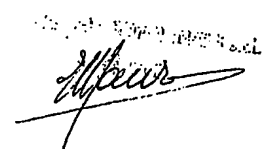
L'effetto della IL-1 sulla cartilagine articolare risulta ampiamente documentato da risultati ottenuti con sperimentazioni *in vivo* effettuati mediante infusione intra-articolare della suddetta interleuchina, la quale determina un danno istologico cartilagineo del tutto simile a quello visibile nella patologia dell'OA (van Beuningen H.M. et al., Arthritis Rheum, 1991, 34:606-615).

Quindi, tutti i dati sperimentali relativi al processo OA supportano fortemente il concetto che IL-1 (in particolare IL-1  $\beta$ ), e probabilmente anche  $TNF\alpha$ , rappresentino il principale sistema catabolico coinvolto nella distruzione dei tessuti articolari e che, inoltre, possano costituire una sorgente endogena di quelle molecole responsabili del suddetto danno cartilagineo.

Infatti, è stato dimostrato che bloccando la produzione e/o l'attivazione di IL-1, si previene e/o si diminuisce la distruzione della







matrice articolare (Caron J.P. et al., Arthritis Rheum, 1996, 39:1535-1544).

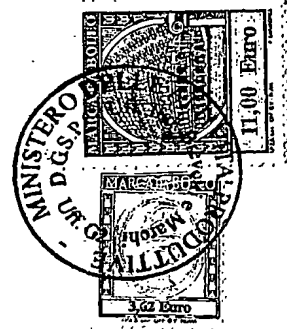
Alti livelli di IL-1 sono stati, inoltre, trovati nel liquido sinoviale di pazienti sofferenti di artrite reumatoide (RA) e di artrite psoriasica (Arend W.P. et al., Arthritis Rheum, 1995, 38:151-160).

L'acido ialuronico (HA) è una delle principali molecole costituenti la matrice cartilaginea ma rappresenta anche la maggiore componente non proteica del liquido sinoviale.

E' una molecola viscoelastica fortemente idrofila che conferisce proprietà lubrificanti al fluido sinoviale e, per questi motivi, l'HA da più di 30 anni viene utilizzato nella patologia dell'OA, soprattutto per il trattamento del dolore ad essa associato (Ghosh P. et al., Semin Arthritis Rheum, 2002, 32: 10-37).

Diverse sperimentazioni scientifiche documentano l'effetto protettivo dell'HA nel mantenimento dell'integrità cartilaginea durante la progressione della patologia OA, poiché dimostrano come questo polisaccaride diminuisce la disgregazione del tessuto articolare determinata dall'IL-1 (Stove J. et al., Journal of Orthopaedic Research, 2002, 20:551-555).

Da oltre una decina d'anni, come nuova terapia dei difetti articolari viene utilizzata la tecnica dell'impianto di condrociti autologhi direttamente nel tessuto cartilagineo lesionato anche se, ultimamente, si stanno diffondendo nuove tecniche d'ingegneria dei tessuti applicate a danni cartilaginei dovuti prevalentemente a





traumi, quindi non applicabili a patologie degenerative come l'OA (Freed L.E. et al., J Biomed Mater Res, 1993, 27: 11-23).

US 5,902,741 descrive e rivendica un tessuto cartilagineo preparato *in vitro*, comprendente una matrice tridimensionale costituita da un polimero biocompatibile (come il collagene, oppure la gelatina, oppure PGA, oppure da polimeri sintetici), in cui possono aderire e proliferare cellule stromali come condrociti o fibroblasti.

US 5,736,372 descrive e rivendica una struttura tridimensionale per la preparazione di cartilagine da impiantare successivamente *in vivo*, costituita da un polimero biodegradabile sintetico (eventualmente anche in combinazione con un 2° polimero non-biodegradabile), in cui possono crescere le cellule condrocitarie.

EP 0907721 descrive e rivendica un substrato per la crescita di cellule (come, ad esempio, i condrociti), formato da una spugna prevalentemente costituita da un derivato dell'HA.

EP 1144459 descrive e rivendica una matrice composita porosa costituita da un derivato dell'HA e da gelatina, caricabile con condrociti per la formazione di un tessuto cartilagineo ingegnerizzato.

EP 1232203 descrive e rivendica la preparazione di una matrice costituita da chitosano per il suo successivo impianto *in vivo*.

WO 03/07873 descrive e rivendica una matrice porosa (spugna) formata prevalentemente da proteine del plasma (come la fibrina), per l'adesione e la proliferazione di cellule stromali come i condrociti.





Fino ad oggi, tutti i tessuti cartilaginei ottenuti *in vitro* con tecniche d'ingegneria tissutale mediante l'utilizzo di biomateriali (sia costituiti da polimeri naturali che semisintetici o sintetici) risultano utilizzabili, mediante impianto chirurgico, solamente all'interno di una lesione cartilaginea non legata ad una patologia degenerativa e/o infiammatoria come, ad esempio, l'OA.

Infatti, in una lesione osteoartrosica il principale ostacolo, all'impianto di un *device* come quelli sopra descritti, risiede nell'alta possibilità/probabilità che s'inserisca un tessuto cartilagineo ingegnerizzato in una capsula articolare arricchita di citochine pro-infiammatorie che, inevitabilmente, determinerebbero (anche per il nuovo tessuto ed entro breve termine), l'instaurarsi di una lenta patologia degenerativa con conseguente degrado delle molecole di matrice neo-sintetizzate dai nuovi tessuti cartilaginei introdotti.

Quest'ipotesi è già stata verificata *in vitro* mediante l'utilizzo di uno *scaffold* costituito da PGA caricato con condrociti d'origine bovina (Kafienah W. et al., Arthritis Rheum. 2003, 48:709-718).

L'oggetto della presente invenzione consiste nella rivendicazione di una matrice tridimensionale costituita da un derivato dell'HA (preferibilmente il suo estere benzilico) eventualmente caricata con condrociti (autologhi e/o allologhi), per la formazione *in vitro* di una nuova cartilagine ingegnerizzata da utilizzare *in vivo* come nuovo tessuto cartilagineo chirurgicamente impiantabile all'interno di una capsula articolare infiammata, in cui si è dunque instaurata una





patologia degenerativa osteo-artririca/osteo-artrosica (che comprende anche l'artrite reumatoide e l'artrite psoriasica) con conseguente degradazione della matrice cartilaginea extracellulare, in quanto viene ampiamente dimostrato e documentato l'effetto protettivo dell'estere benzilico dell'HA (HYAFF®-11) verso la degradazione della cartilagine causata da quegli enzimi proteolitici (definiti metalloproteasi) prodotti in seguito alla suddetta infiammazione.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

L'Applicante intende dimostrare come la matrice tridimensionale costituita da un derivato dell'acido ialuronico lavorato come biomateriale (caricato *in vitro* con condrociti autologhi e/o allologhi), protegga il nuovo tessuto cartilagineo che si forma sia *in vitro* che *in vivo* (dopo l'impianto) dalla degradazione che coinvolge le molecole di matrice determinata dalle citochine pro-infiammatorie che stimolano la produzione (da parte dei condrociti stessi) di enzimi proteolitici come le metalloproteasi.

L'Applicante intende dunque rivendicare l'uso della suddetta matrice tridimensionale come:

- nuova terapia nella cura delle fasi iniziali della patologia dell'OA, all'inizio del processo di degradazione delle molecole componenti la matrice extracellulare della cartilagine;

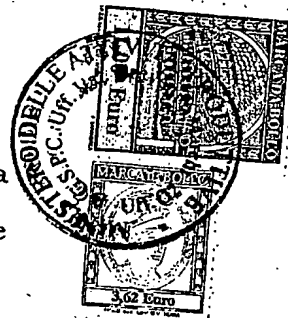


- nuova terapia anche nella cura delle fasi più avanzate della suddetta patologia, in cui sono già visibili zone cartilaginee mediamente e/o fortemente danneggiate.

Queste rivendicazioni nascono dalla dimostrazione che il biomateriale formato dall'estere benzilico dell'HA (brevetto europeo n. 0216453 B1), lavorato in forma di non-tessuto (brevetto europeo n. 0618817 B1), è in grado di proteggere il nuovo tessuto cartilagineo ingegnerizzato dall'azione specifica dell'IL-1 in quanto capace di:

- ridurre e rallentare la degradazione dei proteoglicani (che assieme al collagene ed all'HA rappresentano le principali molecole della matrice extracellulare cartilaginea);
- ridurre e rallentare la degradazione del collagene di tipo II;
- inibire e/o ridurre l'attività enzimatica delle metalloproteasi, enzimi proteolitici soprattutto responsabili della degradazione del collagene di tipo II.

Per i motivi sopra elencati, l'Applicante intende rivendicare l'utilizzo della matrice tridimensionale costituita da un derivato dell'HA, e in modo particolare formata dal suo estere benzilico (HYAFF®-11), come nuova terapia della patologia OA sia nelle sue fasi iniziali, poiché capace di rallentare la degradazione di proteoglicani e di collagene, sia nelle fasi più avanzate della patologia in quanto il suo impianto chirurgico, come nuovo tessuto cartilagineo ingegnerizzato all'interno di una capsula articolare sottoposta a continua degradazione, risulta in grado sia di coprire la lesione cartilaginea precedentemente creata,





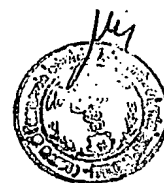
sia di sostituire con nuovo tessuto cartilagineo la matrice extracellulare erosa, matrice che non sarà sottoposta ad ulteriore degradazione poiché protetta dallo HYAFF®-11 dall'azione erosiva dell'IL-1.

L'HA è un etero-polisaccaride composto da residui alternati di acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosammina. E' un polimero a catena lineare con peso molecolare che può variare tra 50.000 e  $13 \times 10^6$  Da, a seconda della fonte dalla quale viene ottenuto e dai metodi di preparazione impiegati. E' presente in natura nei gel pericellulari, nella sostanza fondamentale del tessuto connettivo degli organismi vertebrati (dei quali rappresenta uno dei componenti principali), nel fluido sinoviale delle articolazioni, nell'umor vitreo e nel cordone ombelicale.

L'HA gioca dunque un ruolo importante nell'organismo biologico, soprattutto come supporto meccanico delle cellule di molti tessuti come la pelle, i tendini, i muscoli e la cartilagine.

Inoltre, risulta noto come l'HA, attraverso il suo recettore di membrana CD44, moduli molti e diversi processi relativi alla fisiologia e alla biologia della cellula come, ad esempio, la proliferazione, la migrazione, il differenziamento cellulare e l'angiogenesi, e come svolga altresì altre funzioni come l'idratazione dei tessuti e la lubrificazione delle articolazioni.

L'HA utilizzato nella presente invenzione può derivare da qualsiasi fonte, ad esempio, per estrazione da creste di gallo (brevetto europeo





n. 0138572 B1), per via fermentativa (brevetto europeo n. 0716688 B1), o per via tecnologica, ed avere un peso molecolare compreso tra i 400 e  $3 \times 10^6$  Da, in particolare tra  $1 \times 10^5$  Da e  $1 \times 10^6$  Da, ancor più in particolare tra 200.000 e 750.000 Da.

I derivati dell'HA che possono essere utilizzati nella formazione delle matrici tridimensionali utilizzabili come biomateriali per la preparazione dei nuovi tessuti ingegnerizzati, sono di seguito elencati:

- 1) HA salificato con basi organiche e/o inorganiche;
- 2) HYAFF®: esteri dell'HA con alcoli della serie alifatica, aralifatica, cicloalifatica, aromatica, ciclica ed eterociclica, con una percentuale di esterificazione che può variare a seconda del tipo e della lunghezza dell'alcool usato, preferibilmente tra il 50 e il 100%, mentre la restante percentuale di HA non esterificata può essere salificata con basi organiche e/o inorganiche (brevetto europeo n. 0216453 B1);
- 3) Hyadd™: ammidi dell'HA con ammine della serie alifatica, aralifatica, cicloalifatica, aromatica, ciclica ed eterociclica, con una percentuale di amidazione dal 0,1 al 50%, mentre la restante percentuale di HA non sottoposta ad amidazione può essere salificata con basi organiche e/o inorganiche (domanda di brevetto europea pubbl. n. 1095064);
- 4) Derivati O-solfatati dell'HA fino al 4° grado di solfatazione (brevetto europeo n. 0702699 B1);
- 5) ACP®: esteri interni dell'HA con una percentuale di





esterificazione non superiore al 20%, preferibilmente tra lo 0,05 e il 10% di esterificazione, mentre la restante percentuale di HA non esterificata può essere salificata con basi organiche e/o inorganiche (brevetto europeo n. 0341745 B1);

6) Deacetilati dell'HA: derivano dalla deacetilazione della frazione N-acetil-glucosamina con una percentuale di deacetilazione preferibilmente tra lo 0,1 e il 30%, mentre tutti i gruppi carbossilici dell'HA possono essere salificati con basi organiche e/o inorganiche (domanda di brevetto europeo n. 1313772);

7) Hyoxx™: derivati percarbossilati dell'HA ottenuti dall'ossidazione dell'ossidrile primario della frazione N-acetil-glucosamina con grado di percarbossilazione tra lo 0,1 e il 100% e, preferibilmente, tra il 25 e il 75%. Tutti i gruppi carbossilici dell'HA possono essere salificati con basi organiche e/o inorganiche (domanda di brevetto europeo n. 1339753).

Gli esteri dell'acido ialuronico sono i derivati dell'HA che risultano particolarmente importanti nel processo di formazione dei nuovi tessuti ingegnerizzati, tra tutti i suoi esteri è preferibile l'estere benzilico con una percentuale d'esterificazione tra il 50 e il 100%, e più preferibilmente tra il 75 e il 100%.

Risulta anche noto l'utilizzo dei derivati dell'HA per la formazione di fibre (brevetto europeo n. 0618817 B1) che, lavorate a non-tessuto, costituiscono una matrice tridimensionale (priva di componente cellulare) utilizzabile in campo dermatologico; inoltre, le suddette



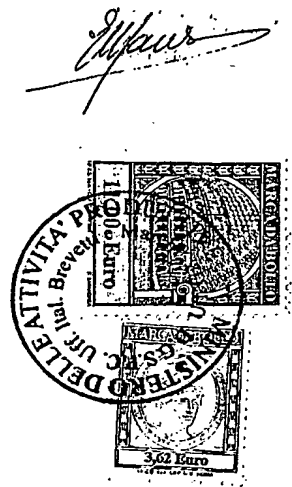


strutture tridimensionali possono essere caricate da cellule mesenchimali e mantenute *in vitro* per un tempo necessario a favorirne la proliferazione e/o il parziale differenziamento (brevetto europeo n. 0863776 B1) anche verso una differenziazione condrocitaria mediante l'utilizzo di specifici fattori trofici.

Numerose sperimentazioni scientifiche hanno ampiamente dimostrato come lo HYAFF® sia un polimero biodegradabile del tutto biocompatibile (Capoccia D. et al., Biomaterials, 1998, 19:2101-2127), capace di indurre e favorire l'adesione, la proliferazione e il ri-differenziamento di condrociti articolari umani precedentemente espansi *in vitro* e successivamente caricati nella matrice tridimensionale formata dal suddetto derivato, per la produzione *in vitro* di una nuova cartilagine contenente, oltre alla componente cellulare, anche una nuova matrice extracellulare (Brun P. et al., J Biomed Mater Res, 1999, 46:337-346; Aigner J. et al., J Biomed Mater Res, 1998, 42:172-181).

Come precedentemente ampiamente discusso, l'oggetto della presente invenzione consiste nella preparazione di un tessuto cartilagineo *in vitro* per la sua applicazione *in vivo* all'interno di un'articolazione colpita da OA, sia nella sue fasi degenerative iniziali che in quelle più avanzate.

Il suddetto tessuto viene preparato utilizzando un derivato dell'HA (preferibilmente HYAFF®-11) lavorato come biomateriale nella forma di una matrice tridimensionale (come, ad esempio, di una spugna



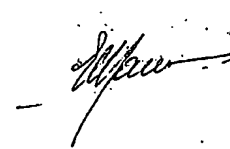


prodotta secondo brevetto europeo n. 0216453 B1, di un tessuto o di una microsfera) e in modo particolare lavorato come non-tessuto, eventualmente caricato *in vitro* con condrociti autologhi e/o allologhi oppure con cellule mesenchimali (le quali potranno anche essere fatte differenziare parzialmente e/o totalmente verso la linea condrocitaria), per la loro adesione, proliferazione e produzione di nuove molecole di matrice extracellulare sia all'interno dello stesso biomateriale durante il tempo di coltura *in vitro*, che successivamente dopo impianto chirurgico all'interno dell'articolazione colpita da patologia OA per la ricostruzione della cartilagine danneggiata.

Per dimostrare e documentare che lo HYAFF®-11 svolge una precisa azione protettiva verso i componenti principali della matrice cartilaginea extracellulare, sono stati pianificati e sviluppati i seguenti esperimenti:

- preparazione di espianti di cartilagine bovina e loro messa in coltura *come tali*;
- preparazione di colture condrocitarie da cartilagine bovina e loro espansione *in vitro*;
- preparazione di una matrice tridimensionale costituita da non-tessuto a base di HYAFF®-11 caricata con condrociti bovini precedentemente espansi *in vitro* (il quale rappresenta il nuovo tessuto cartilagineo ingegnerizzato preparato *in vitro*);
- trattamento con IL-1 sia dell'espianto che della suddetta matrice (precedentemente caricata con condrociti), per poter





determinare l'effetto della citochina pro-infiammatoria verso le molecole di matrice e verso la sintesi di enzimi proteasici;

- misurazione del collagene di tipo II rilasciato per azione dell'IL-1 sia dall'espianto che dalla matrice ingegnerizzata;
- misurazione dei proteoglicani rilasciati per azione dell'IL-1 sia dall'espianto che dalla suddetta matrice;
- misurazione dell'attività enzimatica delle metalloproteasi dopo trattamento dell'espianto e del tessuto ingegnerizzato con IL-1.

#### Esempio 1

*Preparazione di espianti di cartilagine bovina e loro messa in coltura come tali*

Pezzetti di cartilagine bovina sono stati prelevati da 5 animali adulti e tagliati in sezioni con dimensioni di 25mm X 3mm X 10mm.

Le sezioni sono state quindi lavate in tampone fosfato (PBS) contenente gli antibiotici Penicillina-G, Streptomicina e gli antifungini Fungizone e Amfotericina.

Le sezioni così ottenute sono state poste in pozzetti da coltura immersi in 400µl di terreno di coltura DMEM contenente Glutamina (2 mM), Penicillina-G (200 U/ml), Streptomicina (0.1 mg/ml) e HEPES (10 mM), senza la presenza di siero fetale bovino, in incubatore a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>, per un periodo di 4 settimane.

#### Esempio 2

*Preparazione di colture condrocitarie da cartilagine bovina e loro espansione in vitro*





Pezzetti di cartilagine bovina prelevati da 5 animali adulti e tagliati in sezioni di piccole dimensioni, sono stati sottoposti a digestione enzimatica con ialuronidasi (1 mg/ml) a 37°C per 15 min., successivamente con tripsina (0.25%) a 37°C per ulteriori 30 min. ed, infine, con collagenasi batterica (2 mg/ml) in agitazione continua per una notte intera a temperatura ambiente. Tutti i suddetti enzimi erano stati preparati in DMEM contenente 10 % siero fetale bovino (FCS).

I condrociti così ottenuti sono stati lavati con PBS, centrifugati e risospesi in terreno di coltura DMEM con FCS contenente, inoltre, FGF (1 µl/ml).

Le cellule così ottenute sono state poi seminate in piastre da coltura per permettere la loro proliferazione, per un periodo di 7 giorni, in incubatore a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>.

### Esempio 3

*Preparazione in vitro di nuovo tessuto cartilagineo ingegnerizzato costituito da non-tessuto (scaffold) formato da HYAFF®-11 caricato con condrociti bovini precedentemente espansi in vitro*

A scopo puramente descrittivo e non limitativo viene riportato di seguito un esempio di preparazione *in vitro* di tessuto cartilagineo ingegnerizzato.

Il supporto tridimensionale rappresentato dal non-tessuto di HYAFF®-11 è stato dapprima idratato con terreno di coltura e successivamente caricato con 15X10<sup>6</sup> milioni di condrociti per scaffold.



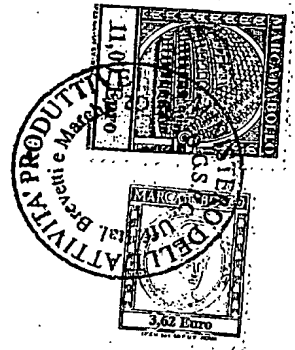
Ogni scaffold è stato quindi posto in una piastra da coltura (alla quale era stato fatto precedentemente aderire un leggero strato di agarosio (1%) per facilitare l'adesione della suddetta matrice ed evitarne i movimenti all'interno della piastra) immerso in terreno DMEM contenente FCS e FGF, in agitazione continua, in incubatore a 37°C per un periodo di 42 giorni. Il fattore trofico FGF è stato aggiunto solamente per i primi 4 giorni, successivamente il terreno è stato sostituito con nuovo terreno DMEM con FCS contenente insulina (10µl/ml) ed acido ascorbico (50µl/ml). Questo terreno veniva cambiato ogni 2-3 giorni.

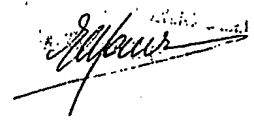
Trascorsi 42 giorni di coltura, ogni scaffold è stato diviso in due e tutti i pezzetti così ottenuti sono stati trasferiti in pozzetti da coltura per altre 4 settimane di coltura immersi in un terreno DMEM privo di FCS (il FCS è un inibitore delle metalloproteasi), contenente Glutamina (2 mM), Penicillina-G (200 U/ml), Streptomycin (0.1 mg/ml) e HEPES (10 mM), con la ulteriore supplementazione di insulina/transferrina/selenio. Tutte le sperimentazioni con IL-1 sono state effettuate con scaffold preparati nel modo sopra descritto.

#### Esempio 4

*Trattamento con IL-1 sia dell'espianto che del tessuto cartilagineo preparato in vitro, per poter determinare l'effetto della citochina pro-infiammatoria verso le molecole di matrice e verso la sintesi di enzimi proteasici*

Un quantitativo pari alla metà delle sezioni degli espianti cartilaginei





effettuati e degli scaffolds contenenti condrociti bovini (preparati *in vitro* come precedentemente descritto), è stato utilizzato per la sperimentazione con IL-1 mentre la seconda corrispondente metà non è stata sottoposta ad alcun trattamento in quanto rappresentava il controllo dell'esperimento non sottoposto a trattamento.

Protocollo di trattamento: IL-1 è stata aggiunta al terreno di coltura alla concentrazione finale di 3 nM. Il suddetto terreno veniva sostituito ogni 2-3 giorni, sempre contenente IL-1 3 nM. Il protocollo di sperimentazione prevedeva un tempo di trattamento con IL-1 di 2 o di 4 settimane. Tutto il terreno eliminato settimanalmente veniva raccolto, diviso per settimana di trattamento e conservato a -20°C per le determinazioni finali.

#### Esempio 5

*Misurazione del collagene di tipo II rilasciato per azione dell'IL-1 sia dall'espianto che dalla matrice ingegnerizzata*

Il terreno di coltura dell'espianto e della matrice ingegnerizzata raccolto per ogni settimana di trattamento con IL-1, è stato sottoposto a specifica digestione enzimatica con proteinasi K (1mg/ml) a 56°C per 15 ore, assieme ai residui dell'espianto e del tessuto raccolti al termine della sperimentazione.

Uno specifico test ELISA (Hollander A.P. et al., J Clin. Invest., 1994, 93:1722-1732) è stato utilizzato per la misurazione del quantitativo di collagene di tipo II presente sia nei campioni di terreno raccolti settimanalmente (compresi i controlli non trattati) che per la





determinazione del collagene rimasto all'interno dell'espianto e della matrice di HYAFF®-11 dopo trattamento con IL-1.

#### Esempio 6

*Misurazione dei proteoglicani rilasciati per azione dell'IL-1 sia dall'espianto che dalla matrice ingegnerizzata*

Il terreno di coltura sia dell'espianto che della matrice ingegnerizzata raccolto per ogni settimana di trattamento con IL-1, è stato sottoposto a specifica digestione enzimatica con proteinasi K come precedentemente descritto per la determinazione del collagene, assieme ai residui dell'espianto e della matrice raccolti al termine della sperimentazione.

Mediante l'utilizzo dello specifico colorante DBM (Blu Dimetil-Metilene), utilizzando un particolare test colorimetrico, sono state successivamente determinate le concentrazioni di proteoglicani presenti nei campioni analizzati (Handley C.J. et al., Methods Enzymol., 1995, 248:47-48).

#### Esempio 7

*Misurazione dell'attività enzimatica delle metalloproteasi dopo trattamento con IL-1 sia dell'espianto che del tessuto ingegnerizzato*

L'attività delle metalloproteasi è stata determinata per tutti i terreni di coltura raccolti settimanalmente sia per gli espienti che per i tessuti ingegnerizzati e relativi controlli non sottoposti a trattamento.

Per la determinazione della suddetta attività enzimatica è stato utilizzato un substrato fluorescente (7-metossicumarina-4-





acetil(MCA)-Pro-Leu-Gli-Leu-(3-(2,4-dinitrofenile)-L-2,3-di-amino-propionil)(Dpa)-Ala-Arg-NH). Il suddetto substrato e tutti i campioni raccolti sono stati inizialmente diluiti in tampone Tris-HCL 0,1 M avente pH 7,5, contenente  $\text{CaCO}_3$  10 Mm e 0,2% (v/v) di Triton X-100. L'attività enzimatica di ogni campione è stata misurata, mediante lettura fluorimetrica, dopo 2 min. dall'aggiunta del substrato al campione da analizzare ed espressa come Unità/ $\mu\text{g}$  totali di collagene di tipo II contenuto in ogni campione (quindi, determinati sia nel residuo che nel terreno di coltura) (Kozaci L.D. et al., Arthritis & Rheumatism, 1997, 40.164-174).

#### Risultati

Come Figura 1A chiaramente dimostra, gli espianti di cartilagine bovina dopo 4 settimane di trattamento con IL-1 risultano completamente degradati, mentre il tessuto cartilagineo ingegnerizzato costituito da HYAFF®-11, dopo 4 settimane di trattamento non evidenzia macroscopici cambiamenti (Figura 1B).

Questi risultati sono confermati dalla determinazione del peso dei residui dopo trattamento rispetto al peso dei corrispondenti controlli non trattati (Figure 2 A-B).

La determinazione della percentuale di degradazione dei proteoglicani è stata effettuata calcolando la concentrazione delle molecole nel terreno di coltura per ogni settimana di trattamento con IL-1 (durata del trattamento: 2 settimane), ed è stata espressa come % della concentrazione totale di proteoglicani presenti sia nel residuo (cioè





nel residuo dell'espianto o nel residuo della matrice ingegnerizzata) che nel terreno di coltura corrispondente.

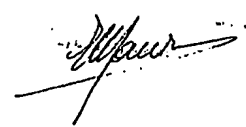
I risultati ottenuti dimostrano che IL-1 induce una significativa degradazione dei proteoglicani negli espienti cartilaginei trattati, con una percentuale di degradazione pari all'86% entro la prima settimana di trattamento (Figura 3A). IL-1 causa la degradazione dei proteoglicani anche nella matrice cartilaginea ingegnerizzata ma il livello di degradazione raggiunge circa il 70% solamente alla 2<sup>a</sup> di trattamento (Figura 3B).

La determinazione del grado di degradazione del collagene di tipo II è stata effettuata calcolando la concentrazione della suddetta proteina nel terreno di coltura per ogni settimana di trattamento con IL-1 (durata del trattamento: 4 settimane), successivamente è stata espressa come % della concentrazione totale di collagene di tipo II presente sia nel residuo (cioè nel residuo dell'espianto oppure nel residuo della matrice ingegnerizzata) che nel terreno di coltura corrispondente.

I risultati ottenuti dimostrano come IL-1, nell'espianto cartilagineo trattato causi la totale degradazione del collagene dopo 4 settimane di trattamento (Figura 4A), mentre il livello di degradazione della proteina per il tessuto a base di HYAFF®-11 risulta essere trascurabile raggiungendo appena il 20% dopo 4 settimane di trattamento (Figura 4B).

L'attività enzimatica totale delle metalloproteasi (MMP) prodotte come





reazione al trattamento con IL-1 sia dall'espianto cartilagineo che dal tessuto ingegnerizzato preparato *in vitro*, sono quantificate in Figura 5 A-B.

IL-1 induce un forte aumento degli enzimi MMP (sia dopo 3 che 4 settimane di trattamento) esclusivamente negli espianti di cartilagine sottoposti a trattamento, mentre non determina alcun aumento della suddetta attività enzimatica nel tessuto ingegnerizzato a base di HYAFF®-11.

Tutti i risultati ottenuti e sopra esposti ci permettono di affermare che il biomateriale costituito da un derivato dell'acido ialuronico, (ed in modo particolare dal suo estere benzilico HYAFF®-11), lavorato in forma di matrice tridimensionale, (e preferibilmente come non-tessuto), esplica una forte azione protettiva nei confronti delle molecole componenti la matrice cartilaginea extracellulare quando quest'ultima è sottoposta all'azione erosiva delle citochine pro-infiammatorie iper-prodotte in una situazione di flogosi come quella che si verifica nella patologia OA, nell'artrite reumatoide e nell'artrite psoriasica.

Per i motivi sopra esposti, l'Applicante intende rivendicare l'utilizzo del supporto/matrice tridimensionale costituito da un derivato dell'acido ialuronico, e preferibilmente da HYAFF®-11 lavorato in forma di non-tessuto, eventualmente contenente anche condrociti e/o cellule mesenchimali, come nuova terapia sia per la prevenzione della degradazione della matrice cartilaginea che per la riparazione della






cartilagine articolare danneggiata in seguito a patologia osteoartritica/osteoartrosica, artrite reumatoide e artrite psoriasica. Essendo l'invenzione così descritta, è chiaro che questi metodi possono essere modificati in vari modi. Tali modificazioni non sono da considerarsi come divergenze dallo spirito e dalle prospettive dell'invenzione e tutte le modifiche che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni.

#### RIVENDICAZIONI

- 1) Biomateriali costituiti da derivati dell'acido ialuronico come nuova terapia di cura per la protezione e la riparazione della cartilagine articolare danneggiata per osteoartrite/osteoartrosi.
- 2) Biomateriali costituiti da derivati dell'acido ialuronico come nuova terapia di cura per la protezione e la riparazione della cartilagine articolare danneggiata per artrite reumatoide e artrite psoriasica.
- 3) Biomateriali secondo le rivendicazioni 1 e 2 in cui i derivati comprendono gli esteri dell'acido ialuronico.
- 4) Biomateriali secondo le rivendicazioni 1 e 2 in cui i derivati comprendono gli esteri interni dell'acido ialuronico con una percentuale di esterificazione interna non superiore al 20%.
- 5) Biomateriali secondo le rivendicazioni 1 e 2 in cui i derivati comprendono le amidi dell'acido ialuronico con una percentuale di amidazione non superiore al 50%.





- 6) Biomateriali secondo la rivendicazione 1 in cui i derivati comprendono i derivati O-solfatati dell'acido ialuronico.
- 7) Biomateriali secondo le rivendicazioni 1 e 2 in cui i derivati comprendono i deacetilati dell'acido ialuronico con una percentuale di deacetilazione non superiore al 30%.
- 8) Biomateriali secondo le rivendicazioni 1 e 2 in cui i derivati comprendono i percarbossilati dell'acido ialuronico.
- 9) Biomateriali secondo la rivendicazione 3 in cui i derivati comprendono l'estere benzilico dell'acido ialuronico.
- 10) Biomateriali secondo la rivendicazione 9 in cui l'acido ialuronico è esterificato dal 50 al 100%.
- 11) Biomateriali secondo le rivendicazioni 9-10 in cui l'acido ialuronico è esterificato dal 75 al 100%.
- 12) Biomateriali costituiti da derivati dell'acido ialuronico secondo tutte le rivendicazioni precedenti lavorati in forma di strutture tridimensionali.
- 13) Biomateriali secondo la rivendicazione 12 lavorati in forma di spugna.
- 14) Biomateriali secondo la rivendicazione 12 lavorati in forma di tessuto.
- 15) Biomateriali secondo la rivendicazione 12 lavorati in forma di non-tessuto.
- 16) Biomateriali secondo la rivendicazione 12 lavorati in forma di microsfere.

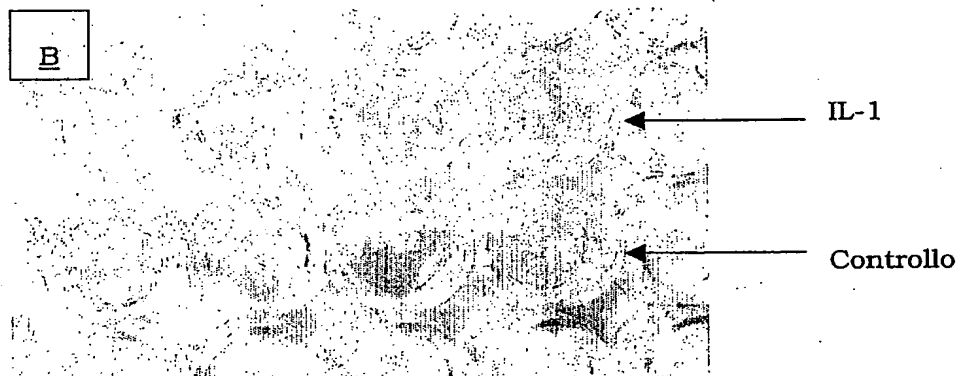
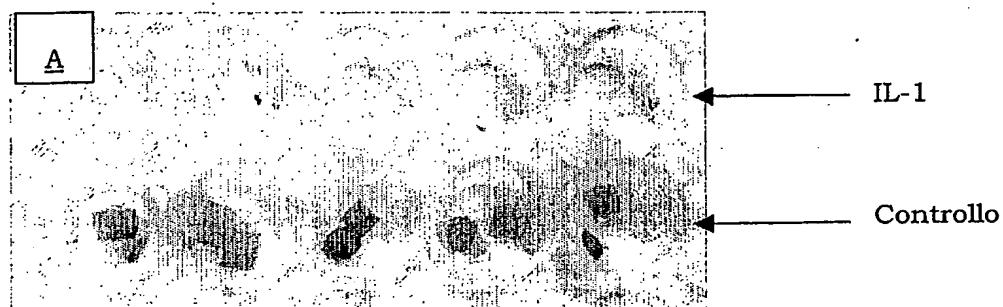




- 17) Biomateriali secondo tutte le rivendicazioni precedenti caricati con condrociti autologhi e/o allologhi.
- 18) Biomateriali secondo tutte le rivendicazioni precedenti caricati con cellule mesenchimali autologhe e/o allologhe.
- 19) Biomateriali secondo la rivendicazione 18 in cui le cellule sono state parzialmente o totalmente differenziate *in vitro*.
- 20) Biomateriali secondo la rivendicazione 15 caricati con condrociti autologhi e/o allologhi.
- 21) Biomateriali secondo la rivendicazione 15 caricati con cellule mesenchimali autologhe e/o allologhe.
- 22) Biomateriali secondo la rivendicazione 21 in cui le cellule sono state parzialmente o totalmente differenziate *in vitro*.



*Carlo Mauri*

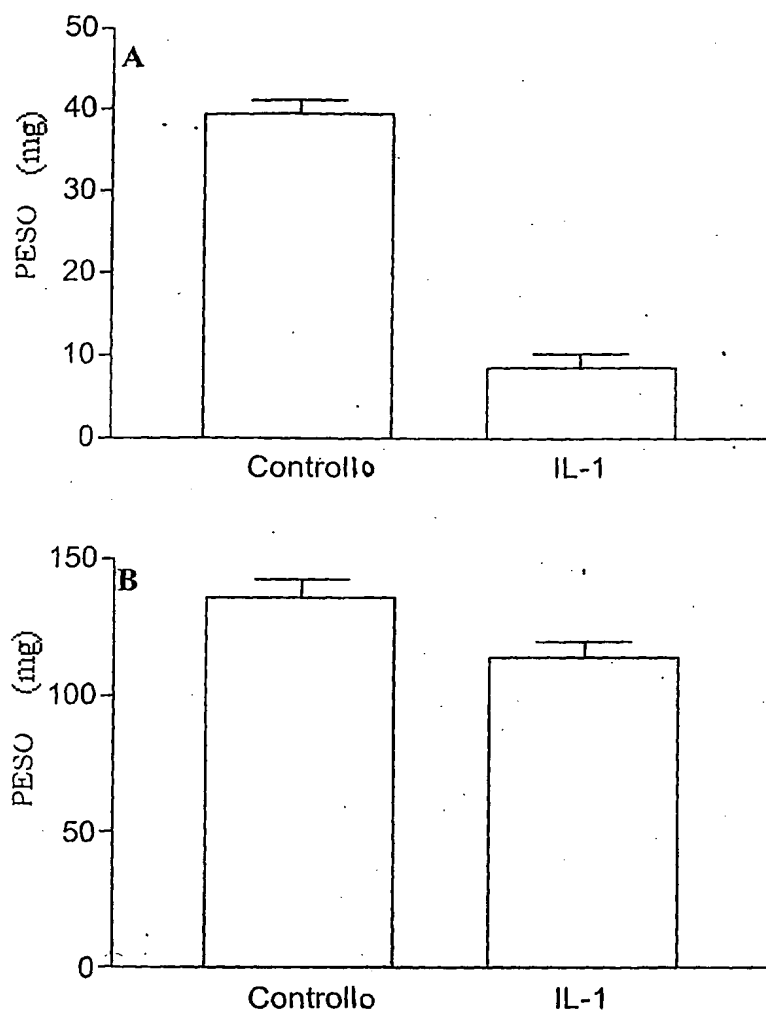


### FIGURA 1 A-B

**Fig. A:** immagine macroscopica degli espianti cartilaginei sottoposti a trattamento con dell'IL-1

**Fig. B:** immagine macroscopica del tessuto cartilagineo ingegnerizzato preparato *in vitro* con HYAFF®-11, dopo trattamento con IL-1

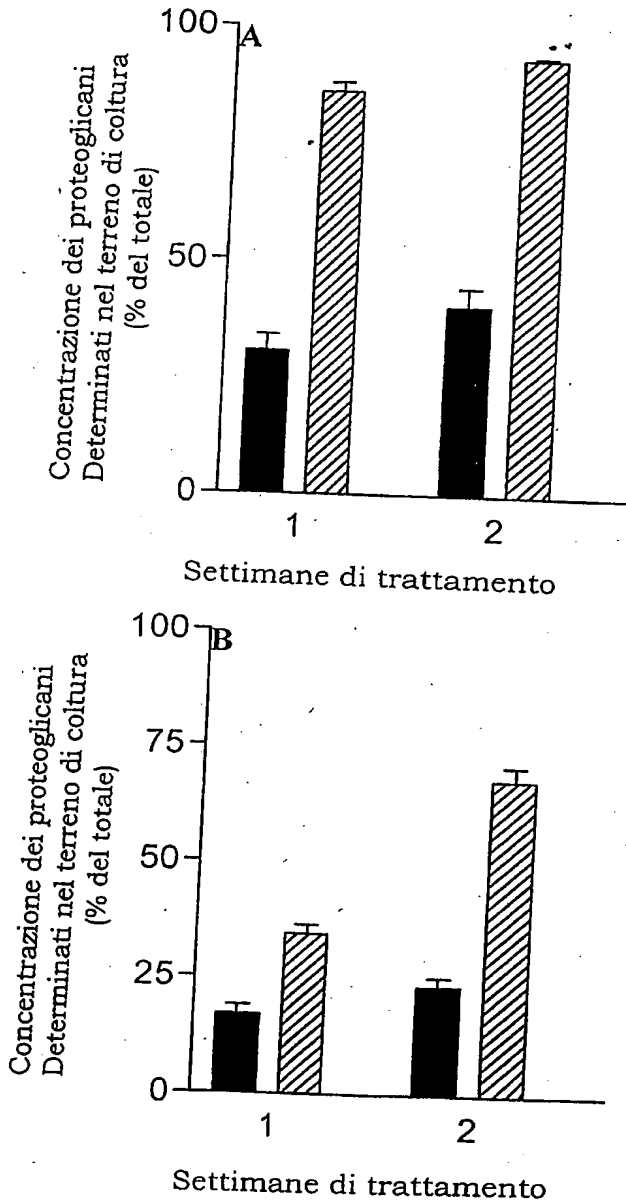


*Illegible signature***FIGURA 2 A-B**

**Fig. A:** effetto dell'IL-1 sul peso degli espianti cartilaginei *in toto*

**Fig. B:** effetto dell'IL-1 sul peso del tessuto cartilagineo ingegnerizzato preparato *in vitro* con HYAFF®-11



**FIGURA 3 A-B**

**Fig. A:** effetto dell'IL-1 sul contenuto dei proteoglicani rilasciati nel terreno di coltura dagli espianti di cartilagine sottoposti a trattamento (barra piena: controllo, barra tratteggiata: IL-1)

**Fig. B:** effetto dell'IL-1 sul contenuto dei proteoglicani rilasciati nel terreno di coltura dal tessuto cartilagineo ingegnerizzato preparato *in vitro* con HYAFF®-11

(barra piena: controllo, barra tratteggiata: IL-1)





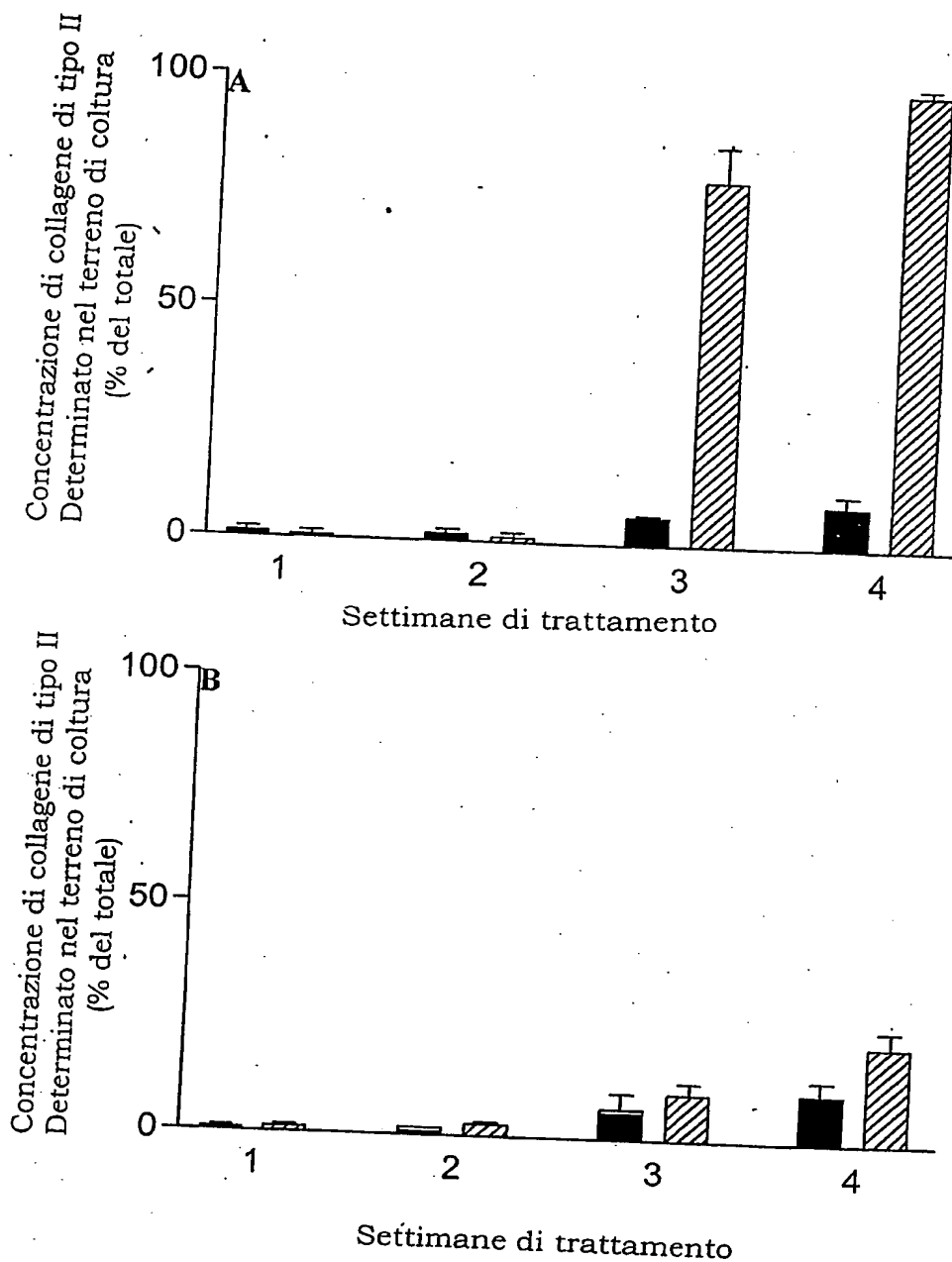
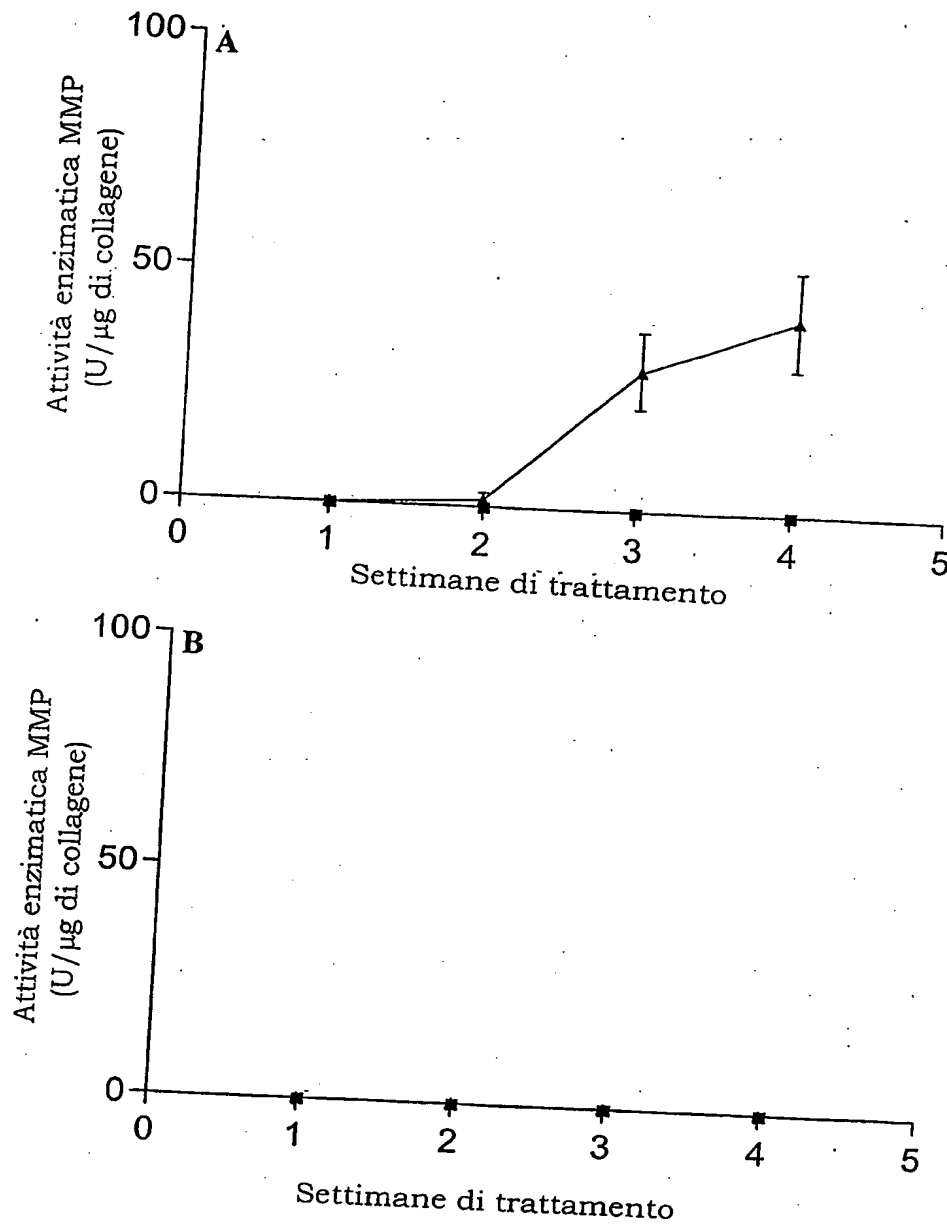


FIGURA 4 A-B

**Fig. A:** effetto dell'IL-1 sul contenuto del collagene di tipo II rilasciato nel terreno di coltura dagli espianti di cartilagine sottoposti a trattamento  
(barra piena: controllo, barra tratteggiata: IL-1)

**Fig. B:** effetto dell'IL-1 sul contenuto del collagene di tipo II rilasciato nel terreno di coltura dal tessuto cartilagineo ingegnerizzato preparato *in vitro* con HYAFF®-11  
(barra piena: controllo, barra tratteggiata: IL-1)

*Myur***FIGURA 5 A-B**

**Fig. A:** effetto dell'IL-1 sull'attività enzimatica delle MMP degli espianti cartilaginei sottoposti a trattamento (quadrato pieno: controllo, triangolo pieno: IL-1)

**Fig. B:** effetto dell'IL-1 sull'attività enzimatica delle MMP del tessuto cartilagineo ingegnerizzato preparato in vitro con HYAFF®-11 (quadrato pieno: controllo, triangolo pieno: IL-1)

